

平成22年 4 月 3 日現在

研究種目：若手研究(スタートアップ)

研究期間：2008～2009

課題番号：20870023

研究課題名(和文) 動原体タンパク質ブリンキンによる分裂期チェックポイント因子の局在化と機能制御機構

研究課題名(英文) The role of kinetochore protein, Blinkin, for the localization and function of mitotic checkpoint proteins

研究代表者 清光 智美 (KIYOMITSU TOMOMI)

京都大学・生命科学研究科・研究員

研究者番号：10503443

研究成果の概要(和文)：

姉妹染色分体の均等な分配には、分裂期チェックポイント因子(Bub1, BubR1)が動原体に局在し機能することが必須である。我々は動原体タンパク質ブリンキンのBub1, BubR1結合最小領域の同定に成功し、このドメインが機能的に重要であることを示した。またブリンキンの動原体局在に必須なhMis12複合体因子hMis14とHeterochromatin Protein-1(HP1)の直接結合を発見し、この結合が双方の局在化を介してインナーセントロメアと動原体の構造形成に機能することを示した。

研究成果の概要(英文)：

Mitotic checkpoint ensures the equal segregation of chromosomes during mitosis. We identified minimal binding region of blinkin with mitotic checkpoint proteins, Bub1 and BubR1, and showed this domain is functionally important. Furthermore we identified blinkin binding kinetochore protein, hMis14, and showed hMis14-HP (heterochromatin protein)-1 interaction is mutually required for their interaction and functions. These results provide the new concept that HP1-dependent inner centromere assembly could affect the kinetochore assembly and mitotic checkpoint.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：染色体分配、動原体、M期チェックポイント

## 1. 研究開始当初の背景

M 期チェックポイントはすべての染色体が微小管に補足されるまで後期進行を阻害する監視機構であり、染色体数恒常性に必須である。またチェックポイント因子の変異が癌細胞や MVA 症候群といった遺伝病で見つかっていることから、その機構の解明は各種疾患の治療法開発にも必須の知見を提供する。M 期チェックポイントタンパク質は 1991 年遺伝学的スクリーニングにより、出芽酵母で同定されて以来、種を通じた保存性、動原体局在、APC/C-Cdc20 を標的とする事が報告されてきたが、動原体で直接相互作用する因子が同定されておらず、動原体局在化機構、及び動原体における活性化機構とその制御機構は分子レベルでほとんど理解されていなかった。我々は M 期チェックポイント因子 Bub1, BubR1 と直接結合するヒト動原体タンパク質ブリンキンの世界で初めて同定し、ブリンキンが動原体におけるチェックポイントシグナル生成に必須であることを示した(Kiyomitsu et al., 2007 Dev. Cell)。

## 2. 研究の目的

我々は M 期チェックポイント因子 Bub1, BubR1 と直接相互作用する動原体タンパク質としてブリンキンを同定し、Bub1, BubR1 が N 末の TPR 構造を介してブリンキンと結合することを示していたが、ブリンキンの Bub1, BubR1 結合部位は不明だった。よって、ブリンキンの Bub 結合最小領域を同定し、機能解析することで、動原体における Bub1, BubR1 の局在化機構、活性化機構を理解することを目的とした。またブリンキンの動原体局在は C 末側配列に依存することが分かっていたが、直接結合する動原体タンパク質とその結合の意義は理解されていなかった。よって、ブリンキンの C 末領域が直接結合する動原体タンパク質を同定し、そのタンパク質との結合の意義、またそのタンパク質の機能について理解することを目指した。

## 3. 研究の方法

生細胞観察や yeast 2-hybrid 法などあらゆる分子生物学的、細胞生物学的実験を駆使する。また共同研究として結晶構造解析も進める。具体的には、yeast 2hybrid 法を用いて

結合タンパク質を同定できれば、その後、配列の保存性に注目して結合欠損変異タンパク質の同定を試みる。結合欠損変異タンパク質が得られれば、RNAi 法を用いて内在性タンパク質をノックダウンしたのち、RNAi 耐性プラスミドをトランスフェクションする、あるいは染色体に組み込んだ RNAi 耐性タンパク質を発現誘導し、内在性のタンパク質と変異タンパク質を置換する。その後生細胞観察などで、M 期の染色体分配動態を解析し、結合の意義を検討する。

## 4. 研究成果

(1) 我々は実施計画に基づいてブリンキンの Bub1, BubR1 結合最小領域 50 アミノ酸の同定に成功した。興味深いことにブリンキンの Bub1, BubR1 結合領域は分離されたが、共通のモチーフを持つことが明らかとなった。さらに共同研究をすすめ、ブリンキン部分断片の精製、結晶化にも成功している。X線構造解析の結果からは両者の結合制御に必須なドメインの存在が示唆されている。またブリンキンと結合する Bub1 の N 末端側配列の単独の結晶構造解析から Bub1 は N 末に新たに 2 つ TPR 構造を持つことが明らかとなり、変異実験によって、これらの TPR 構造もブリンキンとの結合に必要であることを示した。一部の結果は Boranos-Garsia et al., 2009 Structure 誌に報告した。またその他の結果についても、現在投稿準備中である。

(2) ブリンキンの局在制御を理解する目的で、動原体局在に必須なブリンキンの部分断片と hMis12 複合体因子 hMis14/DC8/hNsl1 との直接結合を同定した。また hMis14 との結合に必須なブリンキンのアミノ酸も同定した。このアミノ酸に変異を導入したブリンキンの C 末断片は hMis14 との結合が細胞内でも減少し、動原体局在も減少した。またブリンキンの C 末断片を大量発現すると、M 期染色体整列欠損が観察されたが、hMis14 と結合できない変異を導入すると、このドミナントネガティブ効果は抑制された。このドミナント効果は大量発現されたブリンキン C 末断片が hMis14 と結合し、内在性ブリンキンと hMis14 の結合を阻害するためと考えられた。また N 末の Bub1, BubR1 結合配列を含む領域をブリンキンの C 末断片に融合させると、C 末断片発現によるドミナント効果は一部抑制された。ブリンキンの M 期機能は Bub1, BubR1 結合配列を含む、N 末領域に大きく依存する

ことが示唆された。以上の結果は現在投稿準備中である。

(3)hMis14 はブリンキン以外にも、動原体タンパク質 hMis13、Heterochromatin Protein-1 (HP1) と異なるドメインで直接結合することを明らかにした。hMis14 と HP1 の直接結合は間期で起こり、M 期では減少した。しかし、hMis14 と HP1 の間期での結合は、hMis14 の M 期動原体局在、HP1 の M 期インナーセントロメア局在に必要であり、動原体及びインナーセントロメア双方の構造形成に必要であることを明らかにした。HP1 RNAi や HP1 と結合できない hMis14 変異タンパク質は染色体整列欠損を引き起こした。またこれらの細胞では、hMis14 やブリンキンなどその他の動原体タンパク質のクロマチン結合能が減少していた。これらの結果は、インナーセントロメアに局在する HP1 が染色体分配にも必要であり、インナーセントロメア構造形成が動原体構造形成、および M 期チェックポイントにも関与するという新たな概念を提供した。以上の内容は Kiyomitsu et al., 2010 Journal of Cell Biology 誌に報告した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

① Tomomi Kiyomitsu, Osamu Iwasaki, Chikashi Obuse, Mitsuhiro Yanagida  
Inner centromere formation requires hMis14, a trident kinetochore protein that specifically recruits HP1 to human chromosomes  
The Journal of Cell Biology 誌、査読有、2010, vol.188, p791-807

② 清光智美、小布施力史、柳田充弘  
ブリンキン・紡錘体形成チェックポイントと微小管結合に必須なキネトコア蛋白質-蛋白質核酸酵素 査読有 2009, vol 54-4, p421-426

③ Bolanos-Garcia, V. M., Kiyomitsu, T., D'Arcy, S., Chirgadze, D. Y., Grossmann, J. G., Matak-Vinkovic, D., Venkitaraman, A. R., Yanagida, M., Robinson, C. V., and Blundell, T. L. (2009). The crystal structure of the N-terminal region of BUB1 provides insight into the mechanism of BUB1 recruitment to kinetochores.  
Structure 誌、査読有、2009, vol 17, p105-116.

[学会発表] (計 4 件)

① Kiyomitsu, T., Iwasaki, O., Obuse, C., and Yanagida, M.  
Inner centromere formation requires trident-binding kinetochore protein, hMis14, that specifically recruits HP1 in human chromosome, FASEB SRC: Spindle Assembly and Function, Lucca, Italy, 2009 年8月、ポスター発表、査読有り

② 清光智美  
キネトコアとインナーセントロメア形成の相互依存性  
先端生命科学シンポジウム 染色体の分子構築  
2009年6月26日  
北海道大学

③ Tomomi Kiyomitsu.  
Mutual dependency between kinetochore and inner centromere assemblies  
The 24<sup>th</sup> Naito Conference on “ Nuclear dynamics and RNA(II)”  
2009年6月25日  
シャトレーゼガトーキングダム札幌

④ 清光智美  
ヒトキネトコアタンパク質 hMis14 と HP1 の直接結合が M 期染色体のインナーセントロメア形成に必要である  
第8回核ダイナミクス研究会  
2009年6月20日  
ラフォーレ修善時 静岡県伊豆市大平 1529

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清光智美 (KIYOMITSU TOMOMI)  
京都大学・生命科学研究科・研究員  
研究者番号：10503443

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：